

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

## [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/12  
C12N 15/64 C12N 15/70  
C07K 14/435 C07K 16/16  
C07H 21/02

[21] 申请号 98123826.2

[43]公开日 2000 年 7 月 12 日

[11]公开号 CN 1259574A

[22]申请日 1998.10.29 [21]申请号 98123826.2

[71]申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72]发明人 余 龙 张宏来 屠 强  
傅 强 赵 勇

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 新的人磷脂翻转酶、其编码序列及制法和用途

[57]摘要

本发明涉及了一种新的人磷脂翻转酶 PLS2。本发明提供了该新磷脂翻转酶的 cDNA 编码序列、该序列编码的多肽,以及利用重组技术生产所述的新的磷脂翻转酶的方法。本发明还提供了这种新磷脂翻转酶及其编码序列的应用。

ISSN 1008-4274

## 权 利 要 求 书

1. 一种分离出的DNA分子, 其特征在于, 它包括: 编码具有人PLS2蛋白活性的多肽的核苷酸序列,

5       所述的核苷酸序列与SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列有至少70%的同源性; 或者

      所述的核苷酸序列能在中度严谨条件下与SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列杂交。

2.如权利要求1所述的DNA分子, 其特征在于, 所述的序列编码一多肽, 该多肽具有SEQ ID NO. 4所示的序列。

3.如权利要求1所述的DNA分子, 其特征在于, 该序列具有SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列。

4.一种分离的人PLS2蛋白多肽, 其特征在于, 它包括: 具有SEQ ID NO. 4氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段, 或其活性衍生物。

15       5.如权利要求4所述的多肽, 其特征在于, 该多肽是具有SEQ ID NO. 4序列的多肽。

6.一种载体, 其特征在于, 它含有权利要求1所述的DNA。

7.一种用权利要求6所述载体转化的宿主细胞。

8.如权利要求7所述的宿主细胞, 其特征在于, 该细胞是大肠杆菌。

20       9.如权利要求7所述的宿主细胞, 其特征在于, 该细胞是真核细胞。

10.一种产生具有人PLS2蛋白活性的多肽的方法, 其特征在于, 该方法包括:

(a)将编码具有人PLS2蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列, 形成人PLS2蛋白表达载体, 所述的核苷酸序列与SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列有至少70%的同源性;

25       (b)将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞, 形成人PLS2蛋白的重组细胞;

(c)在适合表达人PLS2蛋白多肽的条件下, 培养步骤(b)中的重组细胞;

(d)分离出具有人PLS2蛋白活性的多肽。

11.如权利要求10所述的方法, 其特征在于, 该序列为SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位。

30       12.一种能与权利要求4所述的人PLS2蛋白多肽特异性结合的抗体。

13.一种核苷酸分子, 其特征在于, 它是权利要求1所述DNA分子的反义序列。

14.一种探针分子，其特征在于，它含有权利要求1所述的DNA分子中约8-100个连续核苷酸。

# 说明书

## 新的人磷脂翻转酶、其编码序列及制法和用途

5 本发明涉及基因工程领域。具体地本发明涉及一种新的多核苷酸，由该多核苷酸编码的多肽，这些多核苷酸和多肽的应用，以及所述多核苷酸和所述多肽的生产方法。本发明的多肽被推断鉴定为一种新的人磷脂翻转酶。

细胞质膜上的磷脂的分布通常是不对称的，磷脂酰胆碱和神经鞘磷脂一般分布在双层膜的外侧，而氨基磷脂、磷脂酰丝氨酸和磷脂酸乙醇胺局限于细胞质一  
10 侧(Schrait A. J. et al Biochim. Biophys. Acta 1071: 313-329, 1991)。磷脂分子在质膜中一般很少发生翻转运动(flip-flop)，但细胞活化、细胞损伤、细胞凋亡等生理活动导致的细胞内 $Ca^{2+}$ 水平上升可以引发质膜中磷脂分子的双向移动(Williamson P. et al Biochemistry 31: 6355-6360, 1992)。磷脂分子在膜两侧的翻转运动能促进凝血系统、补体系统中关键酶的聚集和活化，并加速损伤细胞和凋亡细胞的清除  
15 除(Bevers E. M. et al Blood Rev. 5: 146-154, 1991)。

磷脂翻转酶(phospholipid scramblase, 简称为“PLS”)是近年来新发现的能介导 $Ca^{2+}$ 依赖型磷脂分子翻转运动的一个蛋白质。1996年，Basse等人从人的红细胞中分离得到了一个约37KD的膜整合蛋白，该蛋白具有介导人工脂质体磷脂分子翻转的功能(Basse F. et al J. Biol. Chem. 271(29): 17205-17210, 1996); 1997年，  
20 该实验室Zhou等人克隆了该蛋白的cDNA序列(Zhou Q. et al J. Biol. Chem. 272(29): 18240-18244, 1997); 1998年，Zhou等人又克隆了该蛋白在小鼠中的同源物的cDNA序列(Zhou Q. et al Biochemistry 37: 2356-2360, 1998)。

然而，在本申请之前没有公开过本发明所涉及的新的人磷脂翻转酶或其序列。

25 本发明的一个目的是提供一种新的多核苷酸，该多核苷酸编码一个新的磷脂翻转酶，本发明新的人磷脂翻转酶被命名为人PLS2。

本发明的另一个目的是提供一种新的人磷脂翻转酶蛋白，该酶被命名为人PLS2。

30 本发明的再一个目的是提供一种利用重组技术生产所述的新的磷脂翻转酶的方法。

本发明还涉及这种人磷脂翻转酶核酸序列和多肽的应用。

在本发明的一个方面，提供了一种分离出的DNA分子，它包括：编码具有人PLS2蛋白活性的多肽的核苷酸序列，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列有至少70%的同源性；或者所述的核苷酸序列能在中度严紧条件下与SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列杂交。更佳地，所述的序列编码一多肽，该多肽具有SEQ ID NO. 4所示的序列。更佳地，该序列具有SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列。

在本发明的另一方面，提供了一种分离的人PLS2蛋白多肽，它包括：具有SEQ ID NO. 4氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段，或其活性衍生物。更佳地，该多肽是具有SEQ ID NO. 4序列的多肽。

10 在本发明的另一方面，提供了一种载体，它含有上述分离出的DNA。

在本发明的另一方面，提供了一种所述载体转化的宿主细胞。

在本发明的另一方面，提供了一种产生具有人PLS2蛋白活性的多肽的方法，该方法包括：

15 (a)将编码具有人PLS2蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，形成人PLS2蛋白表达载体，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列有至少70%的同源性；

(b)将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞，形成人PLS2蛋白的重组细胞；

(c)在适合表达人PLS2蛋白多肽的条件下，培养步骤(b)中的重组细胞；

(d)分离出具有人PLS2蛋白活性的多肽。

20 在本发明的一个具体实施方案中，本发明的分离的多核苷酸全长为892个核苷酸，其详细序列见SEQ ID NO. 3，其中开放读框位于118-849位核苷酸。

在本发明中，“分离的”、“纯化的”或“基本纯的”DNA是指，该DNA或片段已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来，还指该DNA或片段已经与天然状态下伴随核酸的组份分开，而且已经与在细胞中伴随其的蛋白质分开。

25 在本发明中，术语“人PLS2蛋白(或多肽)编码序列”指编码具有人PLS2蛋白活性的多肽的核苷酸序列，如SEQ ID NO. 3中118-849位核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指，位于SEQ ID NO. 3序列的编码框118-849位核苷酸中，有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子的简并性，所以与SEQ ID NO. 3中118-849位核苷酸序列同源性低至约70%的简并序列也能编码出SEQ ID NO. 4所述的序列。该术语还包括能在中度严紧条件下，更佳地在高度严紧条件下，与SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849位的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。此外，该术语还包括与SEQ ID NO. 3中从核苷酸118-849

30

位的核苷酸序列的同源性至少70%，较佳地至少80%，更佳地至少90%的核苷酸序列。

该术语还包括能编码具有与人PLS2相同功能的蛋白的、SEQ ID NO. 3中开放阅读框序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于): 若干个(通常为1-90个，  
5 较佳地1-60个，更佳地1-20个，最佳地1-10个)核苷酸的缺失、插入和/或取代，以及在5'和/或3'端添加数个(通常为60个以内，较佳地为30个以内，更佳地为10个以内，最佳地为5个以内)核苷酸。

在本发明中，“基本纯的”蛋白质或多肽是指其至少占样品总物质的至少20%，较佳地至少50%，更佳地至少80%，最佳地至少90%(按干重或湿重计)。纯  
10 度可以用任何合适的方法进行测量，如用柱层析、PAGE或HPLC法测量多肽的纯度。基本纯的多肽基本上不含天然状态下的伴随其的组分。

在本发明中，术语“人PLS2蛋白多肽”指具有人PLS2蛋白活性的SEQ ID NO. 4序列的多肽。该术语还包括具有与人磷脂翻转酶PLS2相同功能的、SEQ ID NO. 4  
15 序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于): 若干个(通常为1-50个，较佳地1-30个，更佳地1-20个，最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内，较佳地为10个以内，更佳地为5个以内)氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括人PLS2蛋白的活性片段和活性衍  
20 生物。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与入PLS2 DNA 杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗人PLS2多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其  
25 他多肽，如包含人PLS2多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还提供了人PLS2多肽的可溶性片段。通常，该片段具有人PLS2多肽序列的至少约10个连续氨基酸，通常至少约30个连续氨基酸，较佳地至少约50个连续氨基酸，更佳地至少约80个连续氨基酸，最佳地至少约100个连续氨基酸。

发明还提供人PLS2蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然人PLS2多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或  
30 者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还可以包括具有不同于天然L-氨基酸的残基

(如D-氨基酸)的类似物, 以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 $\beta$ 、 $\gamma$ -氨基酸)的类似物。应理解, 本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括: 体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化, 如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

在本发明中, “人PLS2保守性变异多肽”指与SEQ ID No. 4的氨基酸序列相比, 有至多10个, 较佳地至多8个, 更佳地至多5个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser

Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

本发明还包括人PLS2多肽编码序列及其片段的反义序列。这种反义序列可用于抑制细胞内人PLS2的表达。

本发明还包括一种可用作探针或引物的核苷酸分子，该分子通常具有人PLS2核苷酸序列的8-100个，较佳地15-50个连续核苷酸。该探针可用于检测样品中是否存在编码人PLS2的核酸分子。

本发明还包括检测人PLS2核苷酸序列的方法，它包括用上述的探针与样品进行杂交，然后检测探针是否发生了结合。较佳地，该样品是PCR扩增后的产物，其中PCR扩增引物对应于人PLS2多肽的编码序列，可位于该编码序列的两侧或中间。引物长度一般为20-50个核苷酸。

在本发明中，可选用本领域已知的各种载体，如市售的载体。比如，选用市售的载体，然后将编码本发明多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，可以形成蛋白表达载体。

如本文所用，“可操作地连于”指这样一种状况，即线性DNA序列的某些部分能够影响同一线性DNA序列其他部分的活性。例如，如果信号肽DNA作为前体表达并参与多肽的分泌，那么信号肽(分泌前导序列)DNA就是可操作地连于多肽DNA；如果启动子控制序列的转录，那么它是可操作地连于编码序列；如果核糖体结合位点被置于能使其翻译的位置时，那么它是可操作地连于编码序列。一般，“可操作地连于”意味着相邻近，而对于分泌前导序列则意味着在阅读框中相邻。

在本发明中，术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞，昆虫细胞、和哺乳动物细胞。较佳地，该宿主细胞是真核细胞，如CHO细胞、COS细胞等。

另一方面，本发明还包括对人PLS2 DNA或是其片段编码的多肽具有特异性抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于人PLS2基因产物或片段。较佳地，指那些能与PLS2基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制人PLS2蛋白的分子，也包括那些并不影响人PLS2蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或



未经修饰形式的人PLS2基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如Fab'或(Fab)<sub>2</sub>片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链Fv分子(Ladner等人，美国专利No. 4,946,778)；或嵌合抗体，如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的人PLS2基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达人PLS2或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人，Nature 256:495, 1975; Kohler 等人，Eur.J.Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人，Eur.J.Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人，In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断人PLS2功能的抗体以及不影响人PLS2功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用人PLS2基因产物的片段或功能区，通过免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与人PLS2基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如*E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

本发明的人PLS2核苷酸序列全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法，可根据本发明所公开的SEQ ID NO.3序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的cDNA库或按已知方法制备的cDNA库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次PCR扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。当然，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

在本发明的一个实施方案中，本发明的多核苷酸全长为892个核苷酸，其详细序列见SEQ ID NO. 3，其中开放读框位于118-849位核苷酸。该多核苷酸是如此获得的，以人脑λgt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板，合成正向引物A1: 5'-TACAGTCCACAGCAACCCAGTAC-3'和反向引物B1: 5'-AGTGCTGACTGTAA

GCCCAATCC-3'进行PCR, 获得892bp的目的片段。测序后得到SEQ ID NO. 3的全长cDNA序列。

根据同源比较的结果, 本发明的核苷酸序列及其编码的蛋白质序列与不同来源的磷脂翻转酶显示了显著的同源性, 因此, 这表明它是磷脂翻转酶的一个新的同系物, 并且具有磷脂翻转酶蛋白的一些重要功能。

细胞质膜上的磷脂分子是不对称分布的(Schrait A. J. et al Biochim. Biophys. Acta 1071: 313-329, 1991)。细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 水平上升可导致磷脂分子在脂双层细胞膜上的快速、双向翻转 (Williamson P. et al Biochemistry 31: 6355-6360, 1992)。磷脂翻转酶是在各种细胞的细胞膜上广泛表达, 能介导 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖型的磷脂分子在细胞膜上双向移动的蛋白分子(Basse F. et al J. Biol. Chem. 271(29): 17205-17210, 1996)。磷脂翻转酶介导的磷脂分子在细胞膜脂双层分子的再分布, 对血管止血机制及细胞清除机制有重要作用(Zhou Q. et al J. Biol. Chem. 272(29): 18240-18244, 1997)。磷脂翻转酶的表达水平通常和磷脂酰丝氨酸响应 $\text{Ca}^{2+}$ 水平上升, 翻转至细胞膜外侧的程度相对应(Zhou J. et al J. Biol. Chem. 273(12): 6603-6606, 1998)。人和小鼠的同源物比较显示在该蛋白的胞质部分含有一个保守的、与已知EF手性结构序列很相似的 $\text{Ca}^{2+}$ 结合域 (Zhou Q. et al Biochemistry 37: 2356-2360, 1998)。该结构和 $\text{Ca}^{2+}$ 调节该酶的活性相关 (Zhou J. et al Biochemistry 37: 6361-6366, 1998)。Scott综合症(Scott Syndrome)和磷脂翻转酶的功能丧失有关(Zhou Q. et al J. Biol. Chem. 272(29): 18240-18244, 1997)。与磷脂翻转酶序列有极好吻合的人的白血病生成相关基因MmTRA1b可能和白血病生成及单核细胞性白血病细胞的分化有关(Kasukabe T. et al Biochem Biophys. Res. Commun. 249(2): 449-455, 1998)。

在附图中,

图1为本发明的人PLS2与小鼠磷脂翻转酶(MPLS)的核酸序列的同源比较图。其中, 相同的核苷酸用“|”标出。

图2为本发明的人PLS2与小鼠磷脂翻转酶(MPLS)的氨基酸序列的同源比较图。其中, 相同的氨基酸在两个序列之间用“|”标出, 相似的氨基酸用“.”标出。相似的氨基酸是: A,S,T; D,E; N,Q; R,K; I,L,M,V; F,Y,W。

图3为本发明的人PLS2与人磷脂翻转酶(HPLS)的核酸序列的同源比较图。其中, 相同的核苷酸用“|”标出。

图4为本发明的人PLS2与人磷脂翻转酶(HPLS)的氨基酸序列的同源比较图。

其中，相同的氨基酸在两个序列之间用“|”标出，相似的氨基酸用“•”标出。  
相似的氨基酸是：A,S,T; D,E; N,Q; R,K; I,L,M,V; F,Y,W.

图5为本发明的人PLS2与人的白血病生成相关基因MmTRA1b的氨基酸序列的同源比较图。

5

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，比如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

10

### 实施例1

#### 人PLS2的cDNA序列的克隆和测定

##### 1. 引物扩增

以人脑  $\lambda$  gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板，用一对寡核苷酸为引物  
15 —A1: 5'-TACAGTCCACAGCAACCCAGTAC-3' (SEQ ID NO.1)为正向引物，寡核苷酸B1: 5'-AGTGCTGACTGTAAGCCCAATCC-3' (SEQ ID NO.2)为反向引物，进行PCR。PCR条件为93℃ 4分钟，随之以93℃ 1分钟、68℃ 1分钟和72℃ 1分钟进行35个循环，最后72℃ 延伸5分钟。电泳检测得到的PCR片段约为900bp的目的片段。

20

##### 2. PCR产物的测序

将如上获得的PCR扩增产物与pGEM-T<sup>®</sup>载体(Promega)连接，转化大肠杆菌JM103，用QIAprep Plasmid试剂盒(QIAGEN)提取质粒，用双链嵌套式缺失试剂盒(Pharmacia)对插入片段进行定向系列缺失，然后用PCR对缺失子进行快速鉴定及  
25 排序。用SequiTherm EXCEL<sup>™</sup> DNA测序试剂盒(Epicentre Technologies)对依次截短的缺失子进行测序，最后用电脑软件拼接顺序，获得全长cDNA序列，共892bp，详细序列见SEQ ID NO. 3。其中开放读框位于118-849位核苷酸。

根据得到的全长cDNA序列推导出人PLS2的氨基酸序列，共243个氨基酸残基，其氨基酸序列详见SEQ ID NO. 4。

30

### 实施例2

#### 同源比较和功能研究

用本发明的人PLS2的全长cDNA序列及其编码蛋白，在Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB数据库及Non-redundant GenBank CDS translations +PDB+SwissProt+Spupdate+PIR数据库中，用BLAST软件进行核酸和蛋白同源检索，结果发现与磷脂翻转酶显示了较高的同源性。用PCGENE软件分析，它与小鼠的磷脂翻转酶(MPLS)(gi|2935162|gb|AF015790|AF015790)在核酸水平上有70.3%的同一性(图1)，在蛋白水平上有48.6%的同一性并另有13.6%的氨基酸相似(图2)；又如，它与人的磷脂翻转酶(HPLS)(gi|2282600|gb|AF008445|AF008445)在核酸水平上有70.3%的同一性(图3)，在蛋白水平上有48.6%的同一性并另有13.6%的氨基酸相似(图4)。这表明，本发明的新蛋白是磷脂翻转酶家族的一员，并且可以用磷脂翻转酶的功能来推测人PLS2的功能。

研究表明，细胞质膜上的磷脂分子是不对称分布的(Schrait A. J. et al Biochim. Biophys. Acta 1071: 313-329, 1991)。在静止细胞中，磷脂分子自发地在细胞膜双层之间的翻转速率是很慢的，而由细胞活化、细胞损伤、细胞凋亡等引发的细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 水平上升可导致磷脂分子在脂双层细胞膜上的快速、双向翻转，使得原来在细胞质侧的磷脂酰丝氨酸位于外侧，而外侧的磷酸酰乙醇胺变位至细胞质侧(Williamson P. et al Biochemistry 31: 6355-6360, 1992)。磷脂翻转酶是在各种细胞的细胞膜上广泛表达的蛋白分子，它能介导 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖型的磷脂分子在细胞膜上双向移动(Basse F. et al J. Biol. Chem. 271(29): 17205-17210, 1996)。

研究表明，磷脂翻转酶是一个富含脯氨酸类型II的细胞膜蛋白(本发明的蛋白含15个脯氨酸，占蛋白分子全长的6%以上)，并在靠近C端处有一个穿膜区(Zhou Q. et al J. Biol. Chem. 272(29): 18240-18244, 1997)，本发明对应序列为SEQ ID NO. 4中第204位至第224位氨基酸，即LDVKMKAMIFGACFLIDFMYF。这更证实了本发明的新蛋白是新的磷脂翻转酶。

实验表明，氨基磷脂暴露于外侧可促进凝血系统、补体系统中关键酶的聚集和活化，并加速网状内皮系统对损伤细胞、凋亡细胞的清除(Bevers E. M. et al Blood Rev. 5: 146-154, 1991)。磷脂翻转酶介导的 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖型磷脂分子在细胞膜脂双层分子的再分布，对血管止血机制及细胞清除机制有重要作用(Zhou Q. et al J. Biol. Chem. 272(29): 18240-18244, 1997)。定量免疫杂交实验显示血小板中磷脂翻转酶的分子数比红细胞高约10倍，和血小板细胞膜中显著上升的磷脂翻转酶活力相一致(Zhou Q. et al J. Biol. Chem. 272(29): 18240-18244, 1997)。磷脂翻转酶的表达水平通常与磷脂酰丝氨酸随 $\text{Ca}^{2+}$ 水平上升而翻转至细胞膜外侧的程度相对应(Zhou J. et al J. Biol. Chem. 273(12): 6603-6606, 1998)。人和小鼠以及人的

同源物比较显示在该蛋白的胞质部分含有一个保守的和已知EF手性结构序列很相似的Ca<sup>2+</sup>结合域:

D(A/S)DNFGIQFPL D

[注: 该序列中“(A/S)”表示从这2个氨基酸中任选一个氨基酸](Zhou Q. et al  
5 Biochemistry 37: 2356-2360, 1998), 本发明对应序列为SEQ ID NO. 4中第192位至第203位氨基酸, 即DADHFDIHFPLD (其中第197位与第199位氨基酸与已报道的磷脂翻转酶对应氨基酸有所不同, 第195位氨基酸与已报道的磷脂翻转酶对应氨基酸相似), 该结构和Ca<sup>2+</sup>调节该酶的活性相关. 实验证明, 磷脂翻转酶在远离Ca<sup>2+</sup>结合位点的N端的半胱氨酸残基上可以被棕榈酰化. 这种翻译后修饰可能和  
10 该酶的依赖Ca<sup>2+</sup>的活力相关(Zhou J. et al Biochemistry 37: 6361-6366, 1998). 大肠杆菌中表达的重组蛋白显示酶活力和Ca<sup>2+</sup>结合力都显著下降. 硫醚键水解后, 该酶的功能丧失约80%(Zhou J. et al Biochemistry 37: 6361-6366, 1998).

一种遗传缺陷出血病——Scott综合症(Scott Syndrome)就和磷脂翻转酶的功能丧失有关(Zhou Q. et al J. Biol. Chem. 272(29): 18240-18244, 1997). 由Kasukabe  
15 等人新克隆的人的白血病生成相关基因MmTRA1b, 和磷脂翻转酶在氨基酸序列上有极好的吻合, 因此这些蛋白可能和白血病生成及单核细胞性白血病细胞的分化有关(Kasukabe T. et al Biochem Biophys. Res. Commun. 249(2): 449-455, 1998). 本发明的新的磷脂翻转酶与MmTRA1b也有很高的同源性(图5). 这暗示, 本发明的新蛋白与白血病可能也有一定联系.

20 本发明的人PLS2除了可作为该家族一员用于进一步的功能研究, 还可用于与其他蛋白一起产生融合蛋白, 比如与免疫球蛋白一起产生融合蛋白. 此外, 本发明人PLS2还可以与该家族的其他成员进行融合或交换片段, 以产生新的蛋白, 例如将本发明人PLS2的N端与小鼠PLS或人PLS的N端进行交换, 以产生新的活性更高或具有新特性的蛋白.

25 针对本发明人PLS2的抗体, 用于筛选该家族的其他成员, 或者用于亲和纯化相关蛋白(如该家族的其他成员, 比如小鼠PLS).

例如, 本发明人 PLS2 核酸(编码序列或反义序列)可以被引入细胞, 以提高人 PLS2 的表达水平或者抑制人 PLS2 的过度表达. 本发明的人 PLS2 蛋白或其活性多肽片段可以施用于病人, 以治疗或减轻因人 PLS2 缺失、无功能或异常而导致的有关病症. 此外, 还可以用基于本发明的核酸序列或抗体进行有关的诊断或  
30 预后判断.

### 实施例3

#### 人PLS2在大肠杆菌中的表达

编码人PLS2的cDNA序列用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物，用实施例1中得到的片段为模板进行扩增，以合成插入片段。

5'寡核苷酸引物序列为

5'-TTGCGGATCCATGCCAGGGCCAACTCCTAT-3'(SEQ ID NO.5),

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点，接之是由起始密码子开始的人PLS2编码序列的20个核苷酸；

3'寡核苷酸引物序列为

5'-GTTCGTCGACTTAACCATAGGTGATGGCT-3'(SEQ ID NO.6),

该引物含有SalI限制性内切酶的酶切位点，一个翻译终止子和人PLS2的编码的部分序列。

限制性内切酶的酶切位点对应于细菌表达载体pQE-9(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)上的限制性内切酶酶切位点，该质粒载体编码抗生素抗性(Amp<sup>r</sup>)、一个细菌复制起点(ori)、一个IPTG-可调启动子/操纵子(P/O)、一个核糖体结合位点(RBS)、一个6-组氨酸标记物(6-His)以及限制性内切酶克隆位点。

用BamHI和SalI消化pQE-9载体及插入片段，随后将插入片段连接到pQE-9载体并保持开放读框在细菌RBS起始。随后用连接混合物转化购自Qiagen，商品名为M15/rep4的E.coli菌株，M15/rep4含有多拷贝的质粒pREP4，其表达lacI阻遏物并携带卡那霉素抗性(Kan<sup>r</sup>)。在含有Amp和Kan的LB培养皿上筛选转化子，在补加Amp(100 μg/ml)和Kan(25 μg/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的阳性转化子克隆。抽提质粒，测序验证结果表明人PLS2的cDNA插入片段已正确装入载体。

过夜(O/N)培养物以1: 100-1: 250的稀释率稀释，然后接种到大体积培养基中，培养细胞生长至600光密度(OD<sub>600</sub>)为0.4-0.6时，加入IPTG(“异丙基硫代-β-D-半乳糖苷”)至终浓度为1mM。通过使lacI阻遏物失活，IPTG诱导启动P/O导致基因表达水平提高。继续培养细胞3-4小时，随后离心(6000 × g, 20分钟)。超声裂解包涵体，收集细胞并将细胞沉淀溶于6M的盐酸胍中，澄清后，通过在能使含6-His标记物蛋白紧密结合的条件下，用镍-螯合柱层析从溶液中纯化溶解的人PLS2。用6M盐酸胍(pH5.0)从柱中洗脱人PLS2。可用几种方法从盐酸胍中变性沉淀蛋白。首先，使用透析步骤除去盐酸胍，或者从镍-螯合柱中分离出的纯化蛋白

可以结合到第二个柱中，该柱中具有递减的线性盐酸胍梯度。在结合到该柱时蛋白质变性，随后用盐酸胍(pH5.0)洗脱。最后，将可溶的蛋白质用PBS进行透析，然后将蛋白质保存在终浓度为10%(w/v)甘油的贮存液中。

用12%的SDS-PAGE胶进行电泳，鉴定表达蛋白的分子量大小为28KDa。

- 5 此外，用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序，发现与SEQ ID NO. 4的序列一致。

#### 实施例4

人PLS2在真核细胞(CHO细胞株)中的表达

- 10 在该实施例中，将编码人PLS2的cDNA序列用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物，用实施例1中得到的片段为模板进行扩增，以合成插入片段。PCR反应中使用的5'寡核苷酸引物序列为：

5'-TTGCAAGCTTATGCCAGGGCCAACTCCTAT-3'(SEQ ID NO.7)，

- 15 该引物含有HindIII限制性内切酶的酶切位点，接之是由起始密码子开始的人PLS2编码序列的20个核苷酸；

3'端引物序列为：

5'-GTTTCGGATCCTTAACCATAGGTGATGGCT-3' (SEQ ID NO.8)

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点、一个翻译终止子和人PLS2的编码的部分序列。

- 20 引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于CHO细胞表达载体pcDNA3上的限制性内切酶酶切位点，该质粒载体编码抗生素抗性(Amp<sup>r</sup>和Neo<sup>r</sup>)、一个噬菌体复制起点(f1 ori)、一个病毒复制起点(SV40 ori)、一个T7启动子、一个病毒启动子(P-CMV)、一个Sp6启动子、一个SV40启动子、一个SV40加尾信号和相应的polyA顺序、一个BGH加尾信号和相应的polyA顺序。

- 25 用HindIII、BamHI消化pcDNA3载体及插入片段，随后将插入片段连接到pcDNA3载体。随后用连接混合物转化E.coli DH5 $\alpha$ 菌株。在含有Amp的LB培养皿上筛选转化子，在补加Amp(100  $\mu$ g/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的克隆。抽提质粒，测序验证结果表明人PLS2的cDNA插入片段已正确装入载体。

- 30 质粒转染是采用脂转染法，用Lipofectin试剂盒(GiBco Life)进行的。转染48小时后，经2-3周的持续G418加压筛选，收集细胞及细胞上清测定表达蛋白酶活力。去G418，连续传代培养；对混合克隆细胞极限稀释，选择具有较高蛋白活性

的细胞亚克隆。按常规方法大量培养上述阳性亚克隆。48小时后，开始收集细胞及上清，用超声裂解方法破碎细胞。以含0.05%Triton的50mM Tris · HCl(pH7.6)溶液为平衡液及洗脱液，用经预平衡的Superdex G-75柱收集上述蛋白的活性峰。再用50mM Tris · HCl(pH8.0)平衡的DEAE-Sepharose柱，以含0-1M NaCl的50mM Tris · HCl(pH8.0)溶液为洗脱液进行梯度洗脱，收集上述蛋白的活性峰。然后以PBS(pH7.4)为透析液对表达蛋白溶液进行透析。最后冻干保存。

用12%的SDS-PAGE胶进行电泳，鉴定表达蛋白的分子量大小为28KDa。

此外，用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序，发现与SEQ ID NO. 4的序列一致。

10

### 实施例5

#### 制备抗体

将实施例3和4获得的重组蛋白用来免疫动物以产生抗体，具体如下。重组分子用层析法进行分离后备用。也可用SDS-PAGE凝胶电泳法进行分离，将电泳条带从凝胶中切下，并用等体积的完全Freund's佐剂乳化。用50-100  $\mu$ g/0.2ml乳化的蛋白，对小鼠进行腹膜内注射。14天后，用非完全Freund's佐剂乳化的同样抗原对小鼠以50-100  $\mu$ g/0.2ml的剂量进行腹膜内注射以加强免疫。每隔14天进行一次加强免疫，至少进行三次。获得的抗血清的特异反应活性用它在体外沉淀人PLS2基因翻译产物的能力加以评估。结果发现，抗体可特异性地与本发明蛋白发生沉淀。

20

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。



## 序列表

### (1)一般信息:

5 (i)申请人: 复旦大学

(ii)发明名称: 新的人磷脂翻转酶、其编码序列及制法和用途

(iii)序列数目: 8

10

### (2)SEQ ID NO.1的信息

#### (i)序列特征

(A)长度: 23碱基

(B)类型: 核酸

15 (C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO.1:

TACAGTCCAC AGCAACCCAG TAC

23

20

### (2)SEQ ID NO.2的信息

#### (i)序列特征

(A)长度: 23碱基

(B)类型: 核酸

25 (C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO : 2:

AGTGCTGACT GTAAGCCCAA TCC

23

30

### (2)SEQ ID NO. 3的信息:

#### (i)序列特征:

(A)长度: 892bp

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

5 (ii)分子类型: cDNA

(xi)序列描述: SEQ ID NO. 3

```

TACAGTCCAC AGCAACCCAG TACCTTCCCT TTGTACCAGC CAGTTGGTGG TATCCATCCT 60
GTCCGGTATC AGCCTGGAAA ATATCCTATG CCAAATCAGT CTGTTCCAAT AACATGGATG 120
10 CCAGGGCCAA CTCCTATGGC AACTGCCCCT CCTGGTCTGG AATACTTAGT TCAGTTGGAC 180
AACATACATG TTCTTCAGCA TTTTGAGCCT CTGGAAATGA TGACATGTTT TGAAACTAAT 240
AATAGATATG ATATTAATAA CAACTTAGAC CAGATTGGTT TTACATTTGT AACCGAAGAC 300
ACAGATGACG GTTACCCGGG AGGAACTGCC TATCGGACAC TAAGGCCCTT CGGTCTCCGG 360
GTCACTGATT GTATGGGCCG AGAAATCATG ACAATGCAGA GACCCTTCAG ATGCACCTGC 420
15 TGTGCTTCT GTTGCCCCTC TGCCAGACAA GAGCTGGAGG TGCAGTGTC TCCTGGTGTC 480
ACCATGGCT TTGTTGCGGA ACATTGGAAC CTGTGCAGGG CGGTGTACAG CATCCAAAAT 540
GAGAAGAAAG AAAATGTGAT GAGAGTTCGT GGGCCATGCT CAACCTATGG CTGTGGTTCA 600
GATTCTGTTT TTGAGGTCAA ATCCCTTGAT GGCATATCCA ACATCGGCAG TATTATCCGG 660
AAGTGGAATG GTTTGTTATC AGCAATGGCA GATGCTGACC ATTTTGACAT TCACTTCCCA 720
20 CTAGACCTGG ATGTGAAGAT GAAAGCCATG ATTTTGGAG CTTGCTTCCT CATTGACTTC 780
ATGTATTTTG AAAGATCTCC ACACAACGTT CAAGATAGAG AGACACAGCA AGCCATCACC 840
TATGGTTAAT TTTGAAAAAT GGAAAAGTTG GATTGGGCTT ACAGTCAGCA CT 892

```

(2)SEQ ID NO. 4的信息:

25 (i)序列特征:

(A)长度: 243个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 多肽

30 (xi)序列描述: SEQ ID NO. 4:

```

Met Pro Gly Pro Thr Pro Met Ala Asn Cys Pro Pro Gly Leu Glu 15
Tyr Leu Val Gln Leu Asp Asn Ile His Val Leu Gln His Phe Glu 30

```

# 98-1102

Pro Leu Glu Met Met Thr Cys Phe Glu Thr Asn Asn Arg Tyr Asp 45  
 Ile Lys Asn Asn Leu Asp Gln Ile Gly Phe Thr Phe Val Thr Glu 60  
 Asp Thr Asp Asp Gly Tyr Pro Gly Gly Thr Ala Tyr Arg Thr Leu 75  
 Arg Pro Phe Gly Leu Arg Val Thr Asp Cys Met Gly Arg Glu Ile 90  
 5 Met Thr Met Gln Arg Pro Phe Arg Cys Thr Cys Cys Cys Phe Cys 105  
 Cys Pro Ser Ala Arg Gln Glu Leu Glu Val Gln Cys Pro Pro Gly 120  
 Val Thr Ile Gly Phe Val Ala Glu His Trp Asn Leu Cys Arg Ala 135  
 Val Tyr Ser Ile Gln Asn Glu Lys Lys Glu Asn Val Met Arg Val 150  
 Arg Gly Pro Cys Ser Thr Tyr Gly Cys Gly Ser Asp Ser Val Phe 165  
 10 Glu Val Lys Ser Leu Asp Gly Ile Ser Asn Ile Gly Ser Ile Ile 180  
 Arg Lys Trp Asn Gly Leu Leu Ser Ala Met Ala Asp Ala Asp His 195  
 Phe Asp Ile His Phe Pro Leu Asp Leu Asp Val Lys Met Lys Ala 210  
 Met Ile Phe Gly Ala Cys Phe Leu Ile Asp Phe Met Tyr Phe Glu 225  
 Arg Ser Pro His Asn Val Gln Asp Arg Glu Thr Gln Gln Ala Ile 240  
 15 Thr Tyr Gly 243

## (2)SEQ ID NO.5的信息

### (i)序列特征

(A)长度: 30碱基

20 (B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO.5:

25 TTGCGGATCC ATGCCAGGGC CAACTCCTAT

30

## (2)SEQ ID NO.6的信息

### (i)序列特征

(A)长度: 29碱基

30 (B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO.6:

GTTCGTCGAC TTAACCATAG GTGATGGCT

29

5 (2)SEQ ID NO.7的信息

(i)序列特征

(A)长度: 30碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

10 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO.7:

TTGCAAGCTT ATGCCAGGGC CAACTCCTAT

30

15 (2)SEQ ID NO.8的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

20 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO.8:

GTTCGGATCC TTAACCATAG GTGATGGCT

29



PLS2 - TTGAGCCTCTGGAAATGATGACATGTTTTGAAACTAATAATAGATATGAT -252  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - TTGAACTTCTGGAAGTTTAACAGGTTTTGAAACTAATAACAAATATGAA -600

PLS2 - ATTA AAAACA A C TTAGACCAGATTGGTTTTACATTTGTAACCGAAGACAC -302  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - ATTAAGA ACAGCTTTGGACAGA--GGGTTTAC-TTTCAGCGGAAGATAC -647

PLS2 - AGATGACGGTTACCCGGGAGGAACTGCCTATCGGACACTAAGGCCCTTCG -352  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - TGATTGCTGT-ACCCG--A--AATTGC-TGTGGGCCATCTAGACCTTTTA -691

PLS2 - GTCTCCGGGTC ACTGATTGTATGGGCCGAGAAATCATGACAATGCAGAGA -402  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - CCTTGAGGATTATTGATAATATGGGTCAAGAAGTCATAACTCTGGAGAGA -741

PLS2 - CCCTTCAGATGCACCTGCTGTTGCTTCTGTTGCCCTCTGCCAGACAAGA -452  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - CCACTAAGATGTAGCAGCTGTTG-TT--GT--CCCTGCTGCCTT-CAGGA -785

PLS2 - GCTGGAGGTGCAGTGTCTCTGGTGTCAACATTGGCTTTGTTGCGGAAC -502  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - GATAGAAATCCAAGCTCCTCTGGTGTACCAATAGGTTATGTTATTCAGA -835

PLS2 - ATTGGAACC--TGTGCAGGGCGGTGTACAGCATCCAAATGAGAAGAAAAG -550  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - CTTGGCACCCATGTCTACCAAAGTTTACA--ATTCAAATGAGAAAAGAG -883

PLS2 - AAAATGTGATGAGAGTTCGTGGGCCATGCTCAACCTATGGCTGTGGTTCA -600  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - AGGATGTACTAAAAATAAGTGGTCCATGTGTTGTGTGCAGCTGTTGTGGA -933

PLS2 - GATTCTGTTTTTGAGGTCAAATCCCTTGATGGCATATCCAACATCGGCAG -650  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - GATGTTGATTTTGAGATTAAATCTCTTGATGAACAGTGTGTGGTTGGCAA -983

PLS2 - TATTATCCGGAAGTGGAATGG---TTTGTTATCAGCAATGGCAGATGCTG -697  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - AATTTCCAAGCACTGGACTGGAATTTTGAGAGAGGCATTTACAGACGCTG -1033

PLS2 - ACCATTTTGACATTCACCTCCCACTAGACCTGGATGTGAAGATGAAAGCC -747  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - ATAAC TTTGGAATCCAGTTCCCTTTAGACCTTGATGTTAAAATGAAAGCT -1083

PLS2 - ATGATTTTGGAGCTTGCTTCCTCATTGACTTCATGTATTTTGAAAGATC -797  
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
MPLS - GTAATGATTGGTGCCTGTTTCCTCATTGACTTCATGTTTTTTGAAAGCAC -1133

2

98-11-02

PLS2	- T-----CCAC--ACAACGTTCAAGA-----TAG-----AGAGACA---	-825
MPLS	- TGGCAGCCAGGAACAAAAATCAGGAGTGTGGTAGTGGATTAGTGAAAGTC	-1183
PLS2	- ----CAGCAAGCC-----ATC-----	-837
MPLS	- TCCTCAGGAAATCTGAAGTCTGTATATTGATTGAGACTATCTAAACTCAT	-1233
PLS2	- ACCTAT-----GGTT----AATTTTG	-854
MPLS	- ACCTGTATGAATTAAGCTGTAAGGCCTGTAGCTCTGGTTGTATACTTTTG	-1283
PLS2	- ----AAA-----AATGG-----	-862
MPLS	- CTTTTCAAATTATAGTTTATCTTCTGTATAACTGATTTATAAAGGTTTTT	-1333
PLS2	- -----AAAAG-----	-867
MPLS	- GTACATTTTTTAATACTCATTGTCAATTTGAGAAAAAGGACATATGAGTT	-1383
PLS2	- -TTGGATTGG-----GCTT-----ACAGT	-885
MPLS	- TTTGCATTTATTAATGAACTTCCTTTGAAAAACTGCTTTAAAAAAAAGT	-1433
PLS2	- CAGCACT	-892
MPLS	- CGACGCGGCCGC	-1445

同一性 : 627 ( 70.3%)

图 1 (续)

# 98-1102

PLS2 : 本发明 PLS2 蛋白, 243 残基 MPLS: 小鼠 PLS 蛋白, 318 残基

```

PLS2      - M----- -1
           |
MPLS      - MDKQNSQMNASHPETNLPVGYPPQYPPTAFQGPPGYSGYPGPQVSYP PPP -50

PLS2      - -----PGPTPMANCPPGLE -15
           | | | | | | | |
MPLS      - AGHSGPGPAGFPVPNQPVYNQPVYNQPVGAAGVPWMPAPQPPLNCPGLE -100

PLS2      - YLVQLDNIHVLQHFEPLEMMTCFETNNRYDIKNNLDQIGFTFVTEDTDDG -65
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MPLS      - YLSQIDQILIHQQIELLEVLTGFETNNKYEIKNSFGQRVY-FAAEDT-- -147

PLS2      - YPGGTAYRTLRFGLRVTDGCMGREIMTMQRPFRCTCCCFCCPSARQELEV -115
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MPLS      - CCTRNCGSPSRPFTLRIIDNMGQEVITLERPLRCSSCC--CPCCLQEIEI -195

PLS2      - QCPPGVITIGFVAEHWNL CRAVYSIQNEKKENVMRVRGPCSTYGCSDSVF -165
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MPLS      - QAPPGVPIGYVIQTWHPCLPKFTIQNEKREDVLKISGPCVVCSCCGDVDF -245

PLS2      - EVKSLDGISNIGSIIRKWNGLLSAM-ADADHFDIHFPLDLVDKMKAMIFG -214
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MPLS      - EIKSLDEQCVVGKISKHWTGILREAFDADNFGIQFPLDLVDKMKAVMIG -295

PLS2      - ACFLIDFMYFERSPHNVQDRETQQAITYG -243
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MPLS      - ACFLIDFMFFESTGSQEKGSGV-----W -318

```

同一性: 118 ( 48.6%)  
相似性: 118 + 33 ( 48.6+13.6%=62.2%)

图 2



PLS2N: 本发明 PLS, 892bp

HPLS: 人 PLS, 1445bp

```

PLS2      - TACAG-----TCCACAGCAACC----- -17
           |||      ||| ||| ||| |||
HPLS      - CGCGGCCGCGTCGACCGAAACCAGGAGCCGCGGGTGTTGGCGCAAAGGTT -50

PLS2      - -----CAGTACCTTC----- -27
           |||      ||| ||| |||
HPLS      - ACTCCCAGACCTTTTCCGGCTGACTTCTGAGAAGGTTGCGCAGCAGCTG -100

PLS2      - -----CCT----- -30
           |||
HPLS      - TGCCCGACAGTCTAGAGGCGCAGAAGAGGAAGCCATCGCCTGGCCCCGGC -150

PLS2      - -----TTGT-----AC-----CAGCCAG----- -43
           ||| ||| ||| ||| ||| |||
HPLS      - TCTCTGGACCTTGTCTCGCTCGGGAGCGGAAACAGCGGCAGCCAGAGAAC -200

PLS2      - ----- -43
HPLS      - TGTTTTAATCATGGACAAACAAAACACAGATGAATGCTTCTCACCCGG -250

PLS2      - -----TTG---GT---GGTATCC-----ATCCT----- -60
           ||| ||| ||| ||| ||| |||
HPLS      - AAACAAACTTGCCAGTTGGGTATCCTCCTCAGTATCCACCGACAGCATTG -300

PLS2      - -----GTCCGGTA--- -68
           ||| ||| |||
HPLS      - CAAGGACCTCCAGGATATAGTGGCTACCCTGGGCCCCAGGTGAGTACCC -350

PLS2      - -----TCAG---CCTGGAAAA-----TATCCTATGC -91
           ||| ||| ||| ||| ||| |||
HPLS      - ACCCCCACCAGCCGGCCATTGAGTCTGAGCCAGCTGGCTTTCTGTGCC -400

PLS2      - CAAATCAGTCTGTT-----CCA---ATAA----- -112
           ||| ||| ||| ||| ||| |||
HPLS      - CAAATCAGCCAGTGTATAATCAGCCAGTATATAATCAGCCAGTTGGAGCT -450

PLS2      - -----CATGGATGCCAGGGCCAACCTCCTATGGCAAACCTGCCCTCC -152
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
HPLS      - GCAGGGGTACCATGGATGCCAGCGCCACAGCCTCCATTAAACTGTCCACC -500

PLS2      - TGGTCTGGAATACTTAGTTGAGTTGGACAACATACATGTTCTTCAGCATT -202
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
HPLS      - TGGATTAGAATATTTAAGTCAGATAGATCAGATACTGATTGATCAGCAAA -550

```

图 3

98-11-02

PLS2	- TTGAGCCTCTGGAAATGATGACATGTTTTGAAACTAATAATAGATATGAT -252
HPLS	- TTGAACTTCTGGAAGTTTTAACAGGTTTTGAAACTAATAACAAATATGAA -600
PLS2	- ATTA AAAACA AACTTAGACCAGATTGGTTTTACATTTGTAACCGAAGACAC -302
HPLS	- ATTAAGAACAGCTTTGGACAGA--GGGTTTAC-TTTGCAGCGGAAGATAC -647
PLS2	- AGATGACGGTTACCCGGGAGGAACTGCCTATCGGACACTAAGGCCCTTCG -352
HPLS	- TGATTGCTGT-ACCCG--A--AATTGC-TGTGGGCCATCTAGACCTTTTA -691
PLS2	- GTCTCCGGGTCAC T GATTGTATGGGCCGAGAAATCATGACAATGCAGAGA -402
HPLS	- CCTTGAGGATTATTGATAATATGGGTCAAGAAGTCATAACTCTGGAGAGA -741
PLS2	- CCCTTCAGATGCACCTGCTGTTGCTTCTGTTGCCCTCTGCCAGACAAGA -452
HPLS	- CCACTAAGATGTAGCAGCTGTTG-TT--GT--CCCTGCTGCCTT-CAGGA -785
PLS2	- GCTGGAGGTGCAGTGTCTCCTGGTGTACCATTTGGCTTTGTTGCGGAAC -502
HPLS	- GATAGAAATCCAAGCTCCTCCTGGTGTACCAATAGGTTATGTTATTCAGA -835
PLS2	- ATTGGAACC--TGTGCAGGGCGGTGTACAGCATCCAAAATGAGAAGAAAG -550
HPLS	- CTTGGCACCCATGTCTACCAAAGTTTACA--ATTCAAATGAGAAAAGAG -883
PLS2	- AAAATGTGATGAGAGTTCGTGGGCCATGCTCAACCTATGGCTGTGGTTCA -600
HPLS	- AGGATGTACTAAAAATAAGTGGTCCATGTGTTGTGTGCAGCTGTTGTGGA -933
PLS2	- GATTCTGTTTTTGAGGTCAAATCCCTTGATGGCATATCCAACATCGGCAG -650
HPLS	- GATGTTGATTTTGAGATTAAATCTCTTGATGAACAGTGTGTGGTTGGCAA -983
PLS2	- TATTATCCGGAAGTGAATGG---TTTGTATCAGCAATGGCAGATGCTG -697
HPLS	- AATTTCCAAGCACTGGACTGGAATTTTGAGAGAGGCATTTACAGACGCTG -1033
PLS2	- ACCATTTTGACATTCACTTCCCACTAGACCTGGATGTGAAGATGAAAGCC -747
HPLS	- ATAAC TTTGGAATCCAGTTCCCTTTAGACCTTGATGTTAAATGAAAGCT -1083
PLS2	- ATGATTTTGGAGCTTGCTTCCTCATTGACTTCATGTATTTTGAAAGATC -797
HPLS	- GTAATGATTGGTGCCTGTTTCCTCATTGACTTCATGTTTTTGAAAGCAC -1133

图 3 (续)

98-11-02

```

PLS2   - T-----CCAC--ACAACGTTCAAGA-----TAG-----AGAGACA--- -825
        |      |||      |||      |||      |||      |||      |||
HPLS    - TGGCAGCCAGGAACAAAAATCAGGAGTGTGGTAGTGGATTAGTGAAAGTC -1183

PLS2   - ----CAGCAAGCC-----ATC----- -837
        ||| ||| |
HPLS    - TCCTCAGGAAATCTGAAGTCTGTATATTGATTGAGACTATCTAACTCAT -1233

PLS2   - ACCTAT-----GGTT---AATTTTG -854
        ||| |
HPLS    - ACCTGTATGAATTAAGCTGTAAGGCCTGTAGCTCTGGTTGTATACTTTTG -1283

PLS2   - -----AAA-----AATGG----- -862
        |||
HPLS    - CTTTTCAAATTATAGTTTATCTTCTGTATAACTGATTTATAAAGGTTTTT -1333

PLS2   - -----AAAAG----- -867
        |||||
HPLS    - GTACATTTTTTAATACTCATTGTCAATTGAGAAAAAGGACATATGAGTT -1383

PLS2   - -TTGGATTGG-----GCTT-----ACAGT -885
        ||| |||
HPLS    - TTTGCATTTATTAATGAAACTTCCTTGAAAAACTGCTTTAAAAAAAAGT -1433

PLS2   - CAGCACT -892
        | | |
HPLS    - CGACGCGGCCGC -1445

```

同一性 : 627 ( 70.3%)

图 3 (续)

# 98-1100

PLS2 : 本发明 PLS2 蛋白, 243 残基      HPLS: 人 PLS 蛋白, 318 残基

PLS2	- M-----	-1
HPLS	- MDKQNSQMNASHPETNLPVGYPPQYPPTAFQGPPGYSGYPGPQVSYP PPP	-50
PLS2	- -----PGPTPMANCPPGLE	-15
HPLS	- AGHSGPGPAGFPVPNQPVYNQPVYNQPVGAAGVPWMPAPQPPLNCPPGLE	-100
PLS2	- YLVQLDNIHVLQHFEPLEMMTCFETNNRYDIKNNLDQIGFTFVTEDTDDG	-65
HPLS	- YLSQIDQILIHQQIELLEVLTGFETNNKYEIKNSFGQRVY-FAAEDTD--	-147
PLS2	- YPGGTAYRTLRFGLRVTDGCMGREIMTMQRPFRCTCCCFCCPSARQELEV	-115
HPLS	- CCTRNCCGPSRPFTLRIIDNMGQEVITLERPLRCSSCC--CPCCLQEIEI	-195
PLS2	- QCPPGVITIGFVAEHWNL CRAVYSIQNEKKENVMRVRGPCSTYGCSDSVF	-165
HPLS	- QAPPGVPIGYVIQTWHPCLPKFTIQNEKREDVLKISGPCVVCSCCGDVDF	-245
PLS2	- EVKSLDGISNIGSIIRKWNGLLSAM-ADADHFDIHFPLDLVKKAMIFG	-214
HPLS	- EIKSLDEQCVVGKISKHWTGILREAFDADNFGIQFPLDLVKKAMVIG	-295
PLS2	- ACFLIDFMYFERSPHNVQDRETQQAITYG	-243
HPLS	- ACFLIDFMFFESTGSQEQKSGV-----W	-318

同一性: 118 ( 48.6%)

相似性: 118 + 33 ( 48.6+13.6%=62.2%)

图 4

# 93-11-01

PLS2 : 本发明 PLS2 蛋白, 243 残基      MmTRA1b: 318 残基

PLS2	- M-----	-1
MmTRA1b	- MDKQNSQMNASHPETNLPVGYPPQYPPTAFQGPPGYSGYPGPQVSYP PPP	-50
PLS2	- -----PGPTPMANCPPGLE	-15
MmTRA1b	- AGHSGPGPAGFPVPNPQPVYNQPVYNQPVGAAGVPWMPAPQPPLNCPGLE	-100
PLS2	- YLVQLDNIHVLQHFPLEMMTCFETNNRYDIKNNLDQIGFTFVTEDDG	-65
MmTRA1b	- YLSQIDQILIHQQIELLEVLTGFETNNKYEIKNSFGQRVY-FAAEDT--	-147
PLS2	- YPGGTAYRTLRFGLRVTDGCMGREIMTMQRPFRCCTCCCFCCPSARQELEV	-115
MmTRA1b	- CCTRNCCGPSRPFTLRIIDNMGQEVITLERPLRCSSCC--CPCCLQEIEI	-195
PLS2	- QCPPGVITIGFVAEHWNL CRAVYSIQNEKKENVMRVRGPCSTYGCSDSVF	-165
MmTRA1b	- QAPPGVPIGYVIQTWHPCLPKFTIQNEKREDVLKISGPCVVCSCCGDVDF	-245
PLS2	- EVKSLDGISNIGSIIRKWNGLLSAM-ADADHFDIHFPLDLVDVKMAMIFG	-214
MmTRA1b	- EIKSLDEQCVVGKISKHWTGILREAFTDADNFGIQFPLDLVDVKMAVMIG	-295
PLS2	- ACFLIDFMYFERSPHNVQDRETOQAITYG	-243
MmTRA1b	- ACFLIDFMFFESTGSQEQSGV-----W	-318

同一性: 118 ( 48.6%)

相似性: 118 + 33 ( 48.6+13.6=62.2%)

图 5

**N w human phosphatid transf ras , its code s qu nce, prepn. and use  
th reof**

Patent Number: CN1259574  
Publication date: 2000-07-12  
Inventor(s): YU LONG (CN); ZHANG HONGLAI (CN); TU QIANG (CN)  
Applicant(s): UNIV FUDAN (CN)  
Requested Patent: CN1259574  
Application Number: CN19980123826 19981029  
Priority Number(s): CN19980123826 19981029  
IPC Classification: C12N15/12; C12N15/64; C12N15/70; C07K14/435; C07K16/16; C07H21/02  
EC Classification:  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

The present invention relates to new human phosphatidase PLS2. The present invention provides cDNA coding sequence of said new phosphatidase, polypeptide of said sequential code, and method of utilizing recombinant technology to produce said new human phosphatidase. The present invention also provides the application of said new human phosphatidase and its coding sequence.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2